

抑制作用,虽然益肺汤高剂量组的 MRP 基因表达量最低,但与中剂量组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),提示益肺汤高剂量组在抑制 MRP 基因表达上与中剂量组相比并没有优势。

综上所述,通过对平均瘤体积、抑瘤率和 MRP 基因表达量的研究表明,益肺汤可能逆转 A549/DDP 移植瘤的多药耐药性,抑制其生长,并与顺铂产生了协同效应,其机制可能是益肺汤抑制了 A549/DDP 移植瘤多药耐药基因 MRP 的表达,增强了顺铂对 A549/DDP 移植瘤的抑制作用。但是肿瘤多药耐药的形成机制是非常复杂的,MRP 基因的过量表达只是其中的机制之一,所以要彻底揭示益肺汤逆转肿瘤多药耐药的作用机制还有很长的路要走,需要后续的进一步研究。

#### [参考文献]

[1] Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpres-

sion of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line [J]. Science, 1992, 258: 1650-1654.

[2] Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(3): 273-286.

[3] 陶黎阳,黎渐英.肺癌 A549 耐药裸鼠移植瘤模型的建立[J].中国医药指南,2011,9(7):5-14.

[4] 卢伟东,傅仲学,覃勇,等.姜黄素逆转结肠癌裸鼠移植瘤多药耐药的研究[J].第三军医大学学报,2011,33(4):376-380.

(责任编辑:骆欢欢)

## 超微补阳还五汤对侧脑室移植神经干细胞存活和分化的影响

田兆华,唐从耀

深圳市龙岗区中医院,广东 深圳 518172

**[摘要]** 目的:探讨超微补阳还五汤对侧脑室移植神经干细胞(NSCs)存活和分化的影响。方法:采用大脑中动脉线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型,将动物随机分为正常组、假手术组、模型组、模型加空白移植组、模型加 NSCs 移植组、移植联合中药组,给予不同处理,分别于 1、7、14、28 天处死动物,采用免疫组织化学法观察内源性神经再生情况。结果:正常组和苏醒 2 h 后假手术组动物未见神经功能缺损,造模后各手术组动物都存在有明显神经功能缺损,但神经功能评分差异无统计学意义( $P>0.05$ )。随着存活时间延长,各组动物积分逐步减少。用药 7 天和 14 天,NSCs 移植联合中药组神经功能缺损积分降低与其它组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。14 天和 28 天时模型加 NSCs 移植组积分降低多于模型组和模型加空白移植组( $P<0.05$ )。正常组可见少量 BrdU 阳性细胞散在分布于各脑区,但数量少且排列比较稀疏。脑缺血后即可见 BrdU 阳性细胞增加,7 天时达高峰,而且排列紧密,然后逐渐下降,14 天仍高于正常。7 天和 14 天时 NSCs 移植联合中药组阳性细胞数目明显多于同期各组( $P<0.05$ );7 天时模型加 NSCs 移植组阳性细胞数量多于模型组( $P<0.05$ )。结论:超微补阳还五汤通过影响侧脑室移植 NSCs 存活和分化,促进内源性神经再生及神经功能恢复。

**[关键词]** 补阳还五汤;超微;神经干细胞;脑缺血;大鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415(2015)10-0204-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.10.096

## Effect of Micropowder *Buyang Huanwu Tang* on Survival and Differentiation of Neural Stem Cells Transplanted into Lateral Ventricle

TIAN Zhaohua, TANG Congyao

Abstract: Objective: To explore the effect of Micropowder *Buyang Huanwu Tang* (MBYHW) on survival and differentiation of

**[收稿日期]** 2014-11-08

**[作者简介]** 田兆华(1981-),男,主治医师,主要从事中西医结合治疗脑血管疾病研究。

unite neural stem cells (NSCs) transplanted into lateral ventricle in rats. **Methods:** The rat model of focal cerebral ischemia was reproduced by middle cerebral artery occlusion. Rats were randomly divided into following groups, including: the normal (N) group, sham-operated (SO) group, ischemia (I) group, ischemia and blank translation (IBT) group, ischemia and NSCs translation (INT) group and MBYHW and NSCs translation (MNT) group. Animals were correspondingly treated and sacrificed at 1st, 7th, 14th and 28th day point after operation. Endogenous neural regeneration were measured by immunohistochemical staining. **Results:** There were a little BrdU positive cells in brain of N group. After ischemia, BrdU positive cells increased rapidly, and reached the peak at 7th day. The expression of BrdU in MNT group was increased, being significantly more than other groups at 7th and 14th day point after ischemia ( $P < 0.05$ ). The expression of BrdU in INT group was increased, being significantly more than I group at 7th day point after ischemia ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** MBYHW may promote the endogenous neural regeneration and function by affecting the survival and differentiation of NSCs transplanted into lateral ventricle.

**Keywords:** Buyang Huanwu Tang; Micropowder; Neural stem cells; Cerebral ischemia; Rat

脑缺血后半暗区神经元变性、坏死, 易导致神经功能缺损, 神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是一种具有自我增殖和分化产生神经元的细胞群, 可以改善神经功能缺损。本研究通过免疫组化方法观察脑缺血后 5- 溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)的表达, 探讨超微补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠经侧脑室移植后的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 动物分组及处理** 清洁级 SD 大鼠, 体重 250~300 g, 雌雄各半, 上海实验动物中心提供。采用 Longa<sup>[1]</sup>的大脑中动脉线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型, 麻醉固定后切开颈部皮肤, 钝性分离出右侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉, 在颈总动脉分叉处近心端作一小切口, 将一段一端钝圆的 4-0 尼龙线由颈总动脉插入至颈内动脉, 感觉到有轻微阻力为止, 结扎固定, 缝合切口。80 只大鼠造模成功后随机分为模型组、模型加空白移植组、模型加 NSCs 移植组和移植联合中药组各 20 只, 另设正常组、假手术组各 5 只。术后分别存活 1 天、7 天、14 天、28 天, 每组每个时间点各 5 只。模型组为大脑中动脉线栓法建立的局灶性脑缺血大鼠; 模型加 NSCs 移植组动物再给予侧脑室移植 NSCs; 移植联合中药组动物于术后苏醒 2 h 后起灌服超微补阳还五汤药液(4 mL/kg), 每天 1 次, 并给予侧脑室移植 NSCs; 模型加空白移植组给予侧脑室注射与 NSCs 悬液相同剂量的生理盐水, 经处理的上述 4 组均腹腔注射 BrdU 进行累积标记(50 mg/kg), 前 3 天每天 1 次, 之后每周 2 次。假手术组仅切开皮肤, 分离右侧颈总动脉后即缝合, 正常组不做任何处理。

**1.2 NSCs 分离、培养及传代** 取新生 3~5 天 Waster 大鼠鼠脑, 剪碎脑组织, 加入 0.125% 胰酶 - 0.02% EDTA 消化液, 反复吹打、离心, 加入 NSCs 培养液, 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。接种 7 天后, 收集培养液, 1500 rpm 离心 5 min, 去上清液, 加入消化液吹打, 消化至单细胞悬液(单细胞 > 90%), 离心, 收集细胞沉渣, 用条件培养液调至  $2 \times 10^5$ /mL 按 1:2 接种, 传至 3 代即可得到纯化的 NSCs。

**1.3 NSCs 移植** 采用经侧脑室移植法, 即大鼠麻醉后, 固定于鼠脑立体定位仪上, 头部常规皮消毒, 头皮正中切口, 开颅, 将微量注射器定位于前囟后 1 mm, 旁开 1.5 mm, 垂直进针 3.5 mm。匀速缓慢注射 5  $\mu$ L NSCs 悬液, 留针 5 min 后缓慢退出, 消毒, 缝合皮肤。

**1.4 药品试剂及仪器** 补阳还五汤处方来源于清·王清任《医林改错》, 按原方: 黄芪 120 g, 赤芍、川芎、当归尾、地龙、红花、桃仁各 10 g。中药材购自广东省中医院, 制成超微剂备用。BrdU 单克隆抗体购自美国 Chemico 公司。日本 Olympus 公司 BX51 光学显微镜及 Image-Pro Plus 5.1 (IPP 5.1) 图像分析系统。

**1.5 神经功能评分** 待麻醉大鼠清醒 2 h 后按 Longa<sup>[1]</sup> 的 5 级评分标准进行神经功能评分, 0 级: 行为无明显变化—0 分; 1 级: 左前肢屈曲, 左后肢伸展—1 分; 2 级: 有左侧追尾现象—2 分; 3 级: 行走困难, 摇摆不定—3 分; 4 级: 无自发性活动, 有意识障碍—4 分。将 1、2、3 级大鼠确定为成功模型分入各组。

**1.6 阳性细胞及 NSCs 计数** 灌注后取大脑后固定, 梯度脱水, OTC 包埋, 冰冻冠状切片, 25  $\mu$ m/片, 每隔 2 片切 3 片取作标本, 分别用于免疫组化酶学染色及荧光双标染色。取海马部位不同断面切片 5 张, 用 IPP 5.1 图象处理系统自动计数 BrdU 及 nestin 阳性细胞数, 计算其平均值。

**1.7 统计学方法** 所有数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 应用 SPSS17.0 统计软件对数据进行统计分析, 组间比较用单因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠神经功能评分比较** 见表 1。正常组和苏醒 2 h 后假手术组动物未见神经功能缺损, 造模后各手术组动物都存在有明显神经功能缺损, 但神经功能评分差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。随着存活时间延长, 各组动物积分逐步减少。用药 7 天和 14 天, NSCs 移植联合中药组神经功能缺损积分降低与其它组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。14 和 28 天时模型加 NSCs 移植组积分降低多于模型组和模型加空白

移植组( $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠神经功能评分比较( $\bar{x} \pm s$ ) 分

组别	用药 1 天	用药 7 天	用药 14 天	用药 28 天
假手术组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	2.13±0.33	1.81±0.16 <sup>①</sup>	1.21±0.14 <sup>②③</sup>	0.81±0.35 <sup>④</sup>
NSCs 移植联合中药组	2.12±0.48	1.35±0.10	0.74±0.22	0.43±0.37
模型加空白移植组	2.15±0.13	1.97±0.03 <sup>①</sup>	1.81±0.05 <sup>②③</sup>	1.71±0.11 <sup>④</sup>
模型加 NSCs 移植组	2.13±0.41	1.62±0.16 <sup>①</sup>	0.94±0.19 <sup>②</sup>	0.57±0.44

与 NSCs 移植联合中药组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型加 NSCs 移植组比较, ② $P < 0.05$

2.2 各组 BrdU 阳性细胞计数比较 见表 2。正常组可见少量 BrdU 阳性细胞散在分布于各脑区, 但数量少且排列比较稀疏。脑缺血后即可见 BrdU 阳性细胞增加, 7 天时达高峰, 而且排列紧密, 然后逐渐下降, 14 天仍高于正常。7 天和 14 天时 NSCs 移植联合中药组阳性细胞数目明显多于同期各组( $P < 0.05$ ); 7 天时模型加 NSCs 移植组阳性细胞数量多于模型组( $P < 0.05$ )。

表 2 各组 BrdU 阳性细胞计数比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	用药 1 天	用药 7 天	用药 14 天	用药 28 天
模型组	16.15±2.28	25.53±2.41 <sup>②③</sup>	23.16±1.23 <sup>①</sup>	17.99±1.36
NSCs 移植联合中药组	17.37±4.33	38.83±6.40	28.53±1.25	19.46±3.33
模型加空白移植组	16.14±0.72	20.65±1.54 <sup>①</sup>	18.21±0.32 <sup>②</sup>	15.32±1.13
模型加 NSCs 移植组	16.92±2.95	31.44±4.31 <sup>①</sup>	24.75±0.48 <sup>②</sup>	18.15±2.33

与 NSCs 移植联合中药组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型加 NSCs 移植组比较, ② $P < 0.05$

### 3 讨论

NSCs 具有自我更新能力, 能通过不对称分离产生一个与自身相同的细胞和一个与自身不同的细胞<sup>[1]</sup>。成年 NSCs 主要分布于海马齿状回亚颗粒层和脑室旁区, 脑缺血诱导了脑内 NSCs 的增殖和室旁区神经元数量的增加, 与相邻细胞形成突触连接并具有相应的电生理功能。许多研究表明, 中枢神经系统缺血时, 增殖并移行缺血周围区的 NSCs 表现为成熟神经元表型(即内源性神经再生), 一些新生神经元与周围神经元形成胞体树突连接<sup>[2]</sup>, 但大量以细胞凋亡的方式死去, 只有少数新生神经元在缺血后存活 6 周<sup>[3]</sup>。可见机体自身的神经再生能力是十分有限的, 不足以对抗损伤。

同时, 新生细胞也受微环境的调控, 它不仅为其提供营养支持, 且最终引导新生细胞整合至损伤组织。就成体 NSCs 而言, 微环境包括细胞间相互作用、体细胞信号、血管系统、细胞外基质和基板<sup>[4]</sup>。内皮细胞能释放促进胚胎和成体 NSCs 自我更新、抑制其分化和促进神经元产生的因子, 为内源性脑细胞原位再生提供了条件<sup>[5]</sup>。

补阳还五汤是临床治疗缺血性脑中风的常用方剂, 并可以促进干细胞的成活与分化, 抑制 NSCs 移植后的炎症反应, 两者联合使用, 可以最大程度的更加安全地促进缺血区内源性神经再生及功能恢复, 其作用机理可能如下。保护内皮细胞: 本实验通过标记 BrdU 阳性细胞, 证实补阳还五汤不仅有直接保护内皮细胞的作用, 而且还可以通过改善细胞外环境、保持内皮细胞的完整, 并使其最终形成新的神经元<sup>[6]</sup>。调节血管再生因子: 可以促血管内皮细胞分裂增殖、增生和转移。促进血管出芽: 内皮细胞的增殖、分化是形成血管出芽的基础, 本研究证实 NSCs 联合中药可以增强对血管内皮细胞的刺激与趋化作用, 使其增殖、移行和分化, 并改变细胞外基质, 促进神经元的形成<sup>[7]</sup>, 其途径之一便是通过调控 BrdU 的表达来实现的。

### [参考文献]

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [2] Cope EC, Gould E. Cytokines make an indelible impression on neural stem cells[J]. Stem Cell, 2013, 13(5): 507-508.
- [3] Ellen Bible, Omar Qutachi, David Y.S. Chau, et al. Neo-vascularization of the stroke cavity by implantation of human neural stem cells on VEGF-releasing PLGA microparticles[J]. Biomaterials, 2012, 33(30): 7435-7446.
- [4] Deborah J. Culley, Justin D. Boyd, Arvind Palanisamy, et al. Isoflurane Decreases Self-Renewal Capacity of Rat Cultured Neural Stem Cells[J]. Anesthesiology, 2011, 115(4): 754-763.
- [5] Hyung-song Nam, Robert Benezra. High Levels of Id1 Expression Define B1 Type Adult Neural Stem Cells[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(5): 515-526.
- [6] Giovanna M. Bernal, Daniel A. Peterson. Phenotypic and Gene Expression Modification with Normal Brain Aging in GFAP-Positive Astrocytes and Neural Stem Cells[J]. Aging Cell, 2011, 10(3): 466-482.
- [7] Moberg C, Catalano RD, Charnock-Jones DS, et al. VEGF-A and serum withdrawal induced changes in the transcript profile in human endometrial endothelial cells[J]. Reprod Sci, 2010, 17(6): 590-611.
- [8] Oh JS, An SS, Gwak SJ, et al. Hypoxia-specific VEGF-expressing neural stem cells in spinal cord injury model[J]. Neuroreport, 2012, 23(3): 174-178.

(责任编辑: 骆欢欢)